

Wirksamkeitsuntersuchung neuer Photosensitizer im Rahmen der
Photodynamischen Therapie von parodontopathogenen Bakterien

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Vasiliki Papastamou

geboren am 14.03.1982 in Lamia, Griechenland

Gutachter

1. Univ.-Prof. Dr. med. dent. habil. Bernd W. Sigusch, Universität Jena
2. Univ- Prof. Dr. med. dent. habil. Eike Glockmann, Universität Jena
3. Univ. - Prof. Dr. med. dent. Thomas Hoffmann, Universität Dresden

Tag der öffentlichen Verteidigung:

03.02.2015

Abkürzungsverzeichnis

$^1\text{O}_2$: Singulett-Sauerstoff

ALA: aminolävulinsäure

ANOVA: analysis of variance, Varianzanalyse

cfu/ml: koloniebildende Einheiten

cfu/ml: colony-forming-units

E. coli: Escherichia Coli

E. faecalis: Enterococcus faecalis

F. nucleatum: Fusobacterium nucleatum

He-Ne: Helium-Neon

J/cm²:Joule pro Quadratzenimeter

LED: lichtemittierende Diode

OD: optische Dichte

P. gingivalis: Porphyromonas gingivalis

PBS: phosphatgepufferte Salzlösung

PDT: Photodynamische Therapie

p-value: p-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert

RBV: tris-(2,20-bipyridine)-Ruthenium(II)-dikation

RD3: tris-(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)-Ruthenium(II)-dikation

ROS=reactive oxidative species

RSD3: tris-[(1,10-phenanthroline-4,7-diyl)-bis-(benzenesulfo-nato)]-
Ruthenate-tetra-anion

UVA: Ultra-Violette-A-Strahlung

UVB: Ultraviolette-B-Strahlung

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Zusammenfassung	5-6
Einleitung	7-8
Ziele der Arbeit	9
Publizierte Originalarbeit	10-14
Diskussion	15-18
Schlussfolgerungen	19
Literatur- und Quellenverzeichnis	20-26
Anhang:Lebenslauf	27-30
Veröffentlichungen	31
Danksagung	32
Ehrenwörtliche Erklärung	33

Zusammenfassung

Die Photodynamische Therapie ist eine alternative Methode zur Reduktion der Entzündung und zur Bekämpfung parodontopathogener Bakterien im Rahmen der Parodontitisbehandlung. Durch die Aktivierung eines Photosensitizers mit einer geeigneten Lichtquelle entstehen freie Sauerstoffradikale, die Bakterien abtöten können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von drei speziellen Photosensitizern und die Testung des antibakteriellen Effektes auf die parodontalen Schlüsselbakterien *Fusobacterium nucleatum* und *Porphyromonas gingivalis*.

Die parodontopathogenen Bakterienstämme wurden *in vitro* jeweils mit folgenden Photosensitizern inkubiert: (1) dem zweiwertigen hydrophoben Kation, tris-(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)-Ruthenium(II)-dikation (RD3), (2) dem hydrophilen tetra - anion, tris-[(1,10-phenanthroline-4,7-diyl)-bis-(benzenesulfo-nato)] Ruthenate-tetra-anion (RSD3) und (3) dem hydrophilen zweiwertigen Kation, tris-(2,20-bipyridine)-Ruthenium(II)-dikation (RBY). Anschließend erfolgte die photodynamische Aktivierung der Photosensitizer mit einer Halogenlampe (Wellenlänge: 450–485 nm) für 20 Sekunden. Als Kontrolle dienten Bakterien, die (1) nur mit dem Photosensitizer behandelt, jedoch nicht mit Licht aktiviert wurden und (2) Bakterien, die weder mit dem Photosensitizer noch mit Licht in Kontakt kamen. Nach der Behandlung wurden die Bakterienspezies unter anaeroben Bedingungen kultiviert, und bzgl. ihrer Wachstumsraten (cfu/ml) analysiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass besonders die PDT mit dem Photosensitizer RD3 das bakterielle Wachstum hemmt. Dabei konnte die Vitalität von *F. nucleatum* um 4- \log_{10} Schritte gesenkt werden, während das Wachstum von *P. gingivalis* komplett supprimiert wurde. Die antibakteriellen Effekte variierten in Abhängigkeit von der Konzentration. Die beste Wirkung konnte bei einer Konzentration von 12.5 mM erreicht werden. Das positiv geladene

hydrophobe Molekül RD3 bindet sich stärker an die negativ geladene Zellmembran als die beiden anderen Substanzen. Von den drei Substanzen zeigte insgesamt nur das hydrophobe, zweiwertige Kation RD3 im Rahmen der PDT eine besondere antibakterielle Wirkung auf *F. nucleatum* und *P. gingivalis*. Im Vergleich zu RD3 wurde für die anderen beiden Photosensitizer ein geringer bzw. nicht signifikanter phototoxischer Effekt ermittelt. Außerdem zeigte sich, dass die Bakterien, die nur mit dem Photosensitizer behandelt, jedoch nicht mit Licht aktiviert wurden und Bakterien, die nur mit Licht bestrahlt wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe (ohne Photosensitizer, ohne Lichtaktivierung), keine statistisch signifikante Reduktion der Vitalität aufwiesen.

In der vorliegenden Studie wurde bewusst eine geringe Energiedichte gewählt (14 J/cm^2 für 20 Sekunden Bestrahlung), die praxisrelevant ist und eine übermäßige Erhitzung der Bakterienlösung verhindert. Außerdem wurden durch eine Waschprozedur mit PBS freie Photosensitizermoleküle aus dem Medium entfernt, da diese sonst als Filter gewirkt und den Effekt der Behandlung beeinträchtigt hätten.

Es konnte für den Photosensitizer RD3 ein signifikanter phototoxischer Effekt auf die parodontalpathogenen Bakterien *F. nucleatum* und *P. gingivalis* nachgewiesen werden. RD3 ist somit ein geeigneter Photosensitizer für die antimikrobiellen PDT-Verfahren. Um den klinische Effekt nachweisen zu können, sollte zukünftig die Wirkung am Patienten untersucht werden.

Einleitung

Die Parodontitis ist eine, der am häufigsten vorkommende Erkrankung der Mundhöhle. Basierend auf einer Infektion mit parodontalpathogenen Bakterien zeigt sich das klinische Bild in Form von apikalen Epitheleinwachsungen, dem Auftreten parodontaler Taschen, dem Verlust des Alveolarknochens, einer erhöhten Zahnmobilität und der Entzündung des parodontalen Weichgewebes (Flemming 1999). Die wichtigste therapeutische Maßnahme ist die Elimination der pathogenen Bakterien. Jedoch gestaltet sich die antibakterielle Therapie auf Grund der komplexen Struktur und Dynamik des bakteriellen Biofilms schwierig (Diaz 2006, Duarte 2010). *F. nucleatum* fungiert beispielsweise als Bindeglied zwischen den so genannten Früh- und Spätbesiedelern und schafft im Plaquebiofilm die geeigneten Bedingungen für die Ansiedlung anaerober Bakterien, wie z. B. *P. gingivalis* (Duarte 2010, Ximenez-Fyvie 2000). Dabei ist *F. nucleatum* die am häufigsten auftretende Spezies im subgingivalen Zahnbelag, sowohl bei initialer, lokalisierter Parodontitis als auch bei fortgeschrittenen Parodontaldefekten (Ximenez-Fyvie, 2000 Sigusch 2010).

Für die antibakterielle Behandlung stehen bisher verschiedene Methoden zur Verfügung. Im Rahmen der konventionellen Parodontitistherapie werden mechanische Anwendungen, wie Scaling und Wurzelglättung, und die Gabe von Antibiotika kombiniert (Kaldahl 1993, van Winkelhoff 2000, Sigusch 2002). Dennoch gibt es Parodontitisformen, die nur schlecht auf die Behandlung ansprechen und eine hohe Rezidivrate aufweisen (Walker 1993). Die Ursache dafür ist in der bereits beschriebenen Komplexität des bakteriellen Plaquebiofilms zu suchen (Haffajee 1988,1995).

Alternative Methoden konzentrieren sich daher auf die Zerstörung der Biofilmstruktur und auf die anschließende Abtötung der Bakterien. Die Photodynamische Therapie (PDT) stellt in diesem Zusammenhang einen alternativen Behandlungsansatz dar. Bereits Mitte 2000 konnte die Arbeitsgruppe von Sigusch u.a. in verschiedenen Untersuchungen die

antibakterielle Wirkung und die positiven Effekte der PDT auf das klinische Bild der Parodontitis nachweisen (Pfitzner 2004, Sigusch 2005, 2010).

Die Wirksamkeit der PDT basiert auf der Aktivierung von lichtempfindlichen Substanzen, die sich an die Zellmembran pathogener Bakterien angelagert haben. Unter Lichteinwirkung produzieren die so genannten Photosensitizer reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS), die mit Bestandteilen der Bakterien, wie z.B. Enzymen, Nukleinsäuren, Lipiden oder Zellwandmolekülen interagieren und diese zerstören. Die Bakterien sterben ab (Bhatti 1998, 2001, Jori 2004). Es gibt zahlreiche Verbindungen, für die bereits eine phototoxische Wirkung nachgewiesen werden konnte, z.B. Azine oder Cyanine, (Garcia-Fresnadillo 1996, Bhatti 1998, 2001, Hergueta-Bravo 2002, Jori 2004, Villen 2006). Für Rutheniumderivate liegen allerdings bisher nur wenige Untersuchungen vor. Beispielsweise wiesen Villen et al. (2006) die Abtötung von *Enterococcus faecalis* und *Escherichia coli* durch die PDT-Behandlung mit einem Ruthenderivat nach. Das Besondere an dieser Substanzgruppe ist ihre hohe Lichtempfindlichkeit im blauen Spektralbereich. Damit muss die Aktivierung nicht mit einem speziellen Laser erfolgen, sondern es genügt auch die Anwendung einer Polymerisationslampe. Einige Autoren wiesen bereits die Wirksamkeit von sichtbarem Licht im Rahmen von PDT-Applikation nach (Satrom 1987, Paulino 2005). Meist wird jedoch zur photodynamischen Aktivierung eine Laserquelle verwendet, die entsprechende Gefahren, wie z. B. eine thermische und phototoxische Schädigung der Retina, aufweist (Satrom 1987).

Bei der Anwendung von sichtbarem Licht bestehen diese Gefahren nicht. Bisher liegen keine Studien vor, die die Wirksamkeit von Rutheniumderivaten im Rahmen der photodynamischen Therapie mit einer Polymerisationslampe gegenüber parodontalpathogenen Bakterien untersucht haben. Aus diesem Grund war es Ziel der vorliegenden Studie, die Wirkung von drei Rutheniumderivate im Rahmen einer PDT-Anwendung mit sichtbarem Licht gegenüber den parodontalen Schlüssekbakterien *F. nucleatum* und *P. gingivalis* zu untersuchen.

Ziele der Arbeit

Bisher liegen keine entsprechende Untersuchungen vor, die die Wirksamkeit von Rutheniumderivaten im Rahmen der photodynamischen Therapie mit einer Polymerisationslampe gegenüber parodontalpathogenen Bakterien getestet haben.

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, ob Rutheniumderivate auch phototoxisch auf *F. nucleatum* und *P.gingivalis* wirken können.

Zur näheren Charakterisierung der Photosensitizerwirkung und deren Abhängigkeit von bestimmten biochemischen Eigenschaften wurden drei verschiedene Rutheniumderivate gewählt, die sich in Ladung, Hydrophilie und der Produktionsmenge von freien Radikalen unterschieden.

Um selbstständige Effekte der Photosensitizer und der Lichtquelle auszuschließen, wurden Kontrolluntersuchungen durchgeführt, bei denen jeweils die Bakterien nur mit den Photosensitizern oder nur mit der Lichtquelle in Kontakt kamen.

Als Lichtquelle zur Aktivierung der Photosensitizer kam eine Halogenlampe zum Einsatz, die bereits zur Polymerisation von Füllungsmaterialien in der zahnärztlichen Praxis in Anwendung ist. Dies war nur möglich, weil die Rutheniumderivate eine besonders hohe Lichtempfindlichkeit im blauen Spektralbereich aufwiesen. Damit könnte auf den Einsatz spezieller Lasertechnik verzichtet und die damit verbundenen Gefahren verringert werden.

Außerdem wurde für die Untersuchungen eine geringe Energiedichte gewählt (14 J/cm^2 für 20 Sekunden Bestrahlung), um die Erwärmung niedrig zu halten und somit bereits Bedingungen zu schaffen, die für die spätere klinische Anwendung notwendig sind.

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/aob>

Photoinactivation of *F. nucleatum* and *P. gingivalis* using the ruthenium-based RD3 sensitizer and a conventional halogen lamp

V. Papastamou^a, T. Nietzsche^a, H. Staudte^a, G. Orellana^b, B.W. Sigusch^{a,*}

^a Department of Conservative Dentistry, Friedrich Schiller University Jena, Germany

^b Department of Organic Chemistry, Complutense University of Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 5 October 2010

Keywords:

Photosensitizer

Fusobacterium nucleatum

Porphyromonas gingivalis

Photodynamic therapy

ABSTRACT

Objective: The photodynamic therapy (PDT) is an alternative method to suppress oral pathogens by the activation of a photosensitizer with laser light. The aim of this study was to investigate the phototoxic effect of three ruthenium-based photosensitizers on *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*.

Methods: In this in vitro study *F. nucleatum* and *P. gingivalis* were incubated with three photosensitizers: (i) a hydrophobic tris-(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)-ruthenium(II)-dication (RD3), (ii) a hydrophilic tris-[(1,10-phenanthroline-4,7-diyl)-bis-(benzenesulfonato)]-ruthenate tetra-anion (RSD3) and (iii) a lower hydrophilic tris-(2,2'-bipyridine)-ruthenium(II) dication (RBY). The subsequent irradiation was done with blue-band halogen light (450–485 nm) for 20 s using a conventional polymerizer. Control samples consisted of bacterial cell suspension irradiated and non-irradiated in the absence of photosensitizer or incubated with the photosensitizer without irradiation. Bacterial inactivation was determined by the numbers of colony-forming units (cfu/ml) after anaerobic cultivation.

Results: The RD3 photosensitizer reduced the viability of *F. nucleatum* by 4-log 10 and of *P. gingivalis* completely after irradiation for 20 s. The viability loss correlated significantly with the concentration of the RD3 photosensitizer and reached a peak at a concentration of 12.5 μ M ($p < 0.05$). The RSD3 and RBY photosensitizers had distinctly lower phototoxic effects in comparison to RD3.

Conclusion: The RD3 photosensitizer showed a phototoxic effect on *F. nucleatum* and *P. gingivalis*. The results suggest that the application of the RD3 photosensitizer under visible light may be helpful as an adjunct treatment approach to the inactivation of periodontopathogenic bacteria.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Periodontitis is one of the most widespread oral diseases, characterized by gingival bleeding, periodontal pocket formation, attachment loss, and alveolar bone loss.¹ The

development of these effects is due to special bacteria in association with the immunological response of the host. The complex microbial communities that exist on oral surfaces develop by the way of temporally distinct patterns of microbial colonization.^{2,3}

* Corresponding author at: Department of Conservative Dentistry, School of Dental Sciences, Friedrich Schiller University Jena, An der alten Post 4, 07743 Jena, Germany. Tel.: +49 3641 934581.

E-mail address: H.Staudte@gmx.de (B.W. Sigusch).

0003-9969/\$ – see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.archoralbio.2010.10.007

Especially the Gram-negative periodontopathogenic species *Fusobacterium nucleatum* adheres to different Gram-positive early plaque colonizers and is often detectable in the subgingival biofilm, even in early and more localized stages of periodontitis.^{4,5} Other periodontopathogenic bacteria form coaggregations with *F. nucleatum* including the Gram-negative species *Porphyromonas gingivalis*.^{3,5} Both bacteria induce apoptosis in gingival epithelial cells and polymorphonuclear blood cells and suppress immunological defense mechanisms.^{6–8} For that reason the inhibition of these bacteria is one of the crucial steps in the various procedures of treating periodontitis.⁹

The conventional periodontitis therapy includes the mechanical scaling and root planning methods and, in severe cases, adjunctively the application of antibiotics.^{10,11} Not seldom, though, the use of antibiotics induces undesirable side effects, such as allergic reactions, local irritations, and the development of resistant bacteria.^{12,13} Therefore, current research is focused on the investigation of alternative antibacterial strategies.^{14,15} In this context, the photodynamic therapy (PDT) is a new approach that could be a future alternative adjunct to the application of antibiotics.¹⁶ Recently, our group reported that the PDT effectively improved the clinical signs of periodontitis by reducing periodontopathogenic bacteria.^{4,17,18} The underlying mechanism of PDT is the targeting and elimination of bacteria via photosensitizers. These substances bind to bacterial cell wall structures and produce reactive oxidative species (ROS) in response to interaction with a specific wavelength emitted by a suitable light source. ROS interact rapidly with bio-molecules such as enzymes and nucleic acids and with lipid membranes and cell walls. This interaction suppresses the bacteria's protection measures, which leads to cell death.^{19–21}

Meanwhile, a wide variety of photosensitizers have been investigated for their action against Gram-positive and Gram-negative bacteria, namely cationic azines, cyanines, macrocyclic photosensitizers, naturally occurring substances and antibody-linked photosensitizers.^{19–24} Recently, Villén et al.²² reported about the reduction of bacterial survival for *Enterococcus faecalis* (Gram+) and *Escherichia coli* (Gram–) by means of ruthenium-based photosensitizers. The photoexcitation of these photosensitizers is highest in the blue region of the spectrum, which matches that of the light-curing units. No studies are available so far which report on testing ruthenium-based photosensitizers in a PDT approach against periodontopathogenic bacteria.

Most PDT applications are associated with laser light. However, some studies indicate that the usage of visible light is also effective, whereas it does not induce any thermal or photochemical damage to the retina.^{25,26} For that reason, the application of visible light with a hand-held photopolymerizer in PDT offers some advantages over laser light because neither the patient nor the dentist are exposed to high doses of UV-A and UV-B.

The aim of the present study was to investigate the effect of ruthenium-based PDT on the two periodontal species *F. nucleatum* and *P. gingivalis*. A commercially available halogen lamp emitting in the blue spectral region, commonly used for photopolymerization in dental practices, was used as a light source.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

The bactericidal effect of PDT was tested on *F. nucleatum* (DSMZ 20482) and *P. gingivalis* (DSMZ 20709) acquired from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. The strains grew anaerobically (10% CO₂, 10% H₂O, 80% N₂) at 36.5–37.0 °C for 24 h in Schaedler anaerobe broth (Oxoid, Hampshire, England) supplemented with 10 µg/ml menadione (Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany). When cultures reached the stationary phase of growth, the bacterial cells were harvested by centrifugation and resuspended in a phosphate-buffered solution (PBS) at an optical density (OD) of 0.6 at 465 nm, which corresponds to approximately 10⁷ cells/ml.

2.2. Photosensitizers

The three ruthenium-based photosensitizers involved in the study, i.e. tris-(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)-ruthenium(II)-dichloride (RD3), tris-(2,2'-bipyridine)-ruthenium(II)-dichloride (RBY), and tetrasodium-tris-[(1,10-phenanthroline-4,7-diyl)-bis-(benzenesulfonato)]-ruthenate (RSD3) were dissolved under sterile conditions in a solution of ethanol/distilled water (7/100, v/v) to a concentration of 2 mM and stored at 4 °C until use.

2.3. Photosensitization and irradiation procedure

A total of about 10⁷ bacterial cells/ml were incubated in the dark for 15 min with different concentrations (0 µM, 12.5 µM, 25 µM) of each of the three photosensitizers. After this period, the bacteria were classified into two groups: the first one with bacteria unwashed after the incubation period, and the second one with bacteria washed by centrifuging the suspension at 3500 × g for 5 min, re-suspended in PBS, and then placed in wells of black 96-well microtitration plates (160 µl/well). Control samples consisted of bacterial cell suspension irradiated and non-irradiated in the absence of photosensitizer, or incubated with the photosensitizer without irradiation.

Irradiation of the bacterial solutions followed, with the well rim supporting the tip of the light source applicator. To ensure a constant distance to the solution, the halogen light source used (Polofil Lux, Voco, Cuxhaven, Germany) was equipped with a light guide (cross-sectional area 0.5 cm²) for irradiation in the 350–500 nm range, with an emission maximum at 490 nm (Fig. 1). The irradiance applied was 700 mW/cm² (output of light source 350 mW), and the corresponding fluence rate for 20 s was 7 J/cm².

2.4. Determination of bacterial inactivation

Six successive dilutions (1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶) were prepared. Then, 100 µl of the bacteria suspension in each case were spatulated on Schaedler agar plates (Oxoid, Hampshire, England) supplemented with 10 µg/ml menadione (Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany). Incubation proceeded at 37 °C under anaerobic conditions for 4 and 8 days, respectively. After this period, the colony-forming units (cfu/ml) were counted.

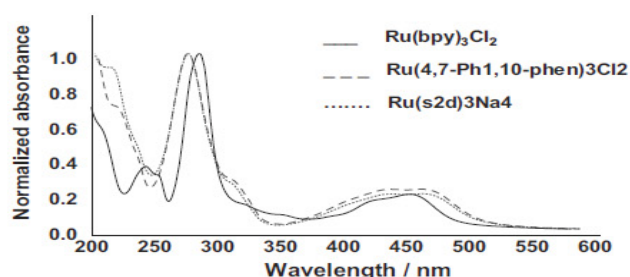


Fig. 1 – Absorption spectra of RBY ($\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$), RD3 ($\text{Ru}(4,7\text{-Ph}1,10\text{-phen})_3\text{Cl}_2$) and RSD3 ($\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_3\text{Na}_4$) in ethanol-water (7/100, v/v). The absorbance maxima in the visible region were recorded at room temperature at 463 nm, 462 nm and 452 nm.

2.5. Statistical analysis

The values reported here are the means of three replicates. A two-way analysis of variance (two-way ANOVA) was performed in order to examine the main effects of irradiation duration and photosensitizer concentration as well as their interaction effect. Moreover, the connection between photosensitizer concentration, duration of irradiation and bacterial survival was evaluated by means of the Mann–Whitney *U*-test or Kruskal–Wallis test. Bonferroni correction was used to account for an increase in type I error due to multiple comparisons. All *p*-values reported were based on two-sided tests. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$. The statistical analysis was carried out with SPSS 17.0 software (SPSS Inc., TX, USA).

3. Results

The results revealed that not all of the three ruthenium-based photosensitizers showed adequate PDT effects. The RD3

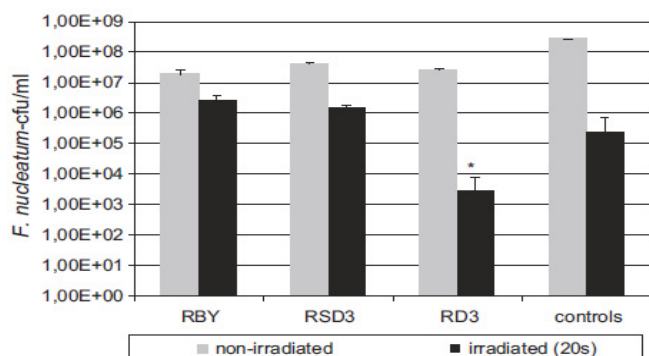


Fig. 2 – Bactericidal effects of PDT using the photosensitizer RBY, RSD3 and RD3 ($12.5 \mu\text{M}/\text{ml}$) on *F. nucleatum*. The light energy delivered was $7 \text{ J}/\text{cm}^2$. Controls consisted of cell suspension irradiated or non-irradiated in the absence of photosensitizers. PDT with RD3 significantly inhibited bacterial growth ($*p < 0.05$).

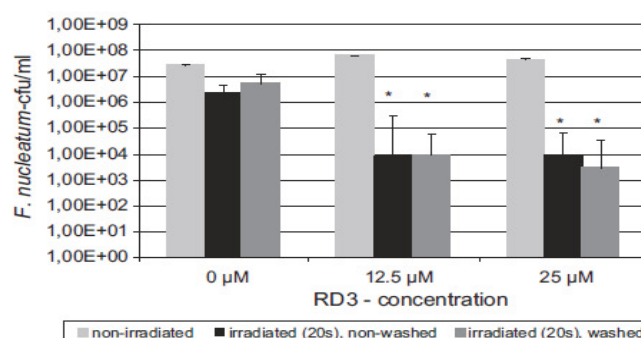


Fig. 3 – Comparative effects of PDT with different concentrations of RD3 photosensitizer (0, 12.5, 25 $\mu\text{M}/\text{ml}$) on *F. nucleatum*. The samples were not washed or washed after incubation with RD3. Both in washed and unwashed samples a significant bacterial growth inhibition was measured ($*p < 0.05$).

photosensitizer had the best suppressive effect on *F. nucleatum* (Fig. 2), as we measured a significant bacterial reduction from $24.8 \times 10^5 \text{ cfu}/\text{ml}$ to $2.8 \times 10^2 \text{ cfu}/\text{ml}$, whereas the RBY and RSD3 photosensitizers did not show any statistically significant antibacterial effect.

The use of different RD3 concentrations disclosed that both $12.5 \mu\text{M}$ and $25 \mu\text{M}$ RD3/ml led to significant reductions of *F. nucleatum* (Fig. 3). The results obtained in washed and unwashed samples were comparable. Although in washed samples the application of $25 \mu\text{M}$ RD3/ml was a little more effective than that of $12.5 \mu\text{M}$ RD3/ml, the difference was statistically insignificant.

In the experiments with *P. gingivalis*, RD3 inhibited these species significantly. After 20 s irradiation, the species *P. gingivalis* was completely suppressed by an RD3 concentration of $12.5 \mu\text{M}$. For the RBY and RSD3 photosensitizers, no effects on *P. gingivalis* were observed (Fig. 4).

The comparison of unwashed and washed samples yielded different results (Fig. 5). In unwashed samples, no statistically significant inhibition of *P. gingivalis* was measured with the RD3 photosensitizer, whereas *P. gingivalis* was significantly reduced in the washed samples. Both concentrations of RD3 ($12.5 \mu\text{M}$ and $25 \mu\text{M}$) caused a complete suppression of this species.

4. Discussion

Ruthenium-based photosensitizers are known as effective agents in the PDT of waterborne bacteria but were not tested for their influence on periodontopathogenic bacteria so far.²² The present study investigated the phototoxic effect of three ruthenium-based photosensitizers against the predominant periodontopathogenic species *F. nucleatum* and *P. gingivalis*. The RD3-photosensitizer had a distinctly antibacterial activity against *F. nucleatum* and *P. gingivalis* after its activation by a conventional halogen light source. One reason for the RD3 effect could be the difference in biochemical properties

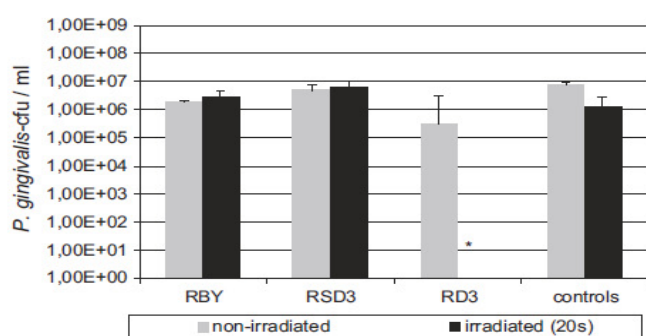


Fig. 4 – Bactericidal effects of PDT using the photosensitizer RBY, RSD3 and RD3 (12.5 μ M/ml) on *P. gingivalis*. The light energy delivered was 7 J/cm². Controls consisted of cell suspension irradiated or non-irradiated in the absence of photosensitizers. PDT with RD3 significantly inhibited bacterial growth (* $p < 0.001$).

between the three photosensitizers used. One factor that influences the photodynamic effect is the ability of binding to the cell structures.²⁷ It can be assumed that the dicationic hydrophobic RD3 photosensitizer attaches to the negatively charged bacterial membrane better than the other ones do. Furthermore, the extent of singlet oxygen generation plays a crucial role regarding the stability, integrity and metabolism of the bacterial cell. In comparison to RBY (0.73 in CH₃OH and 0.22 in H₂O), RD3 exhibits a higher production of singlet oxygen (1.0 in CH₃OH and 0.43 in H₂O), which could be a further reason for its higher efficiency in the PDT procedure.²³ Even though the RSD3 photosensitizer releases a similar amount of singlet oxygen as does RD3, its antibacterial efficiency in the present study proved lower. A possible explanation for this could be a reduced diffusion of the ROS towards the bacterial cell, rather than on ¹O₂ generated directly in the vicinity of the bacterial membrane.^{28,29}

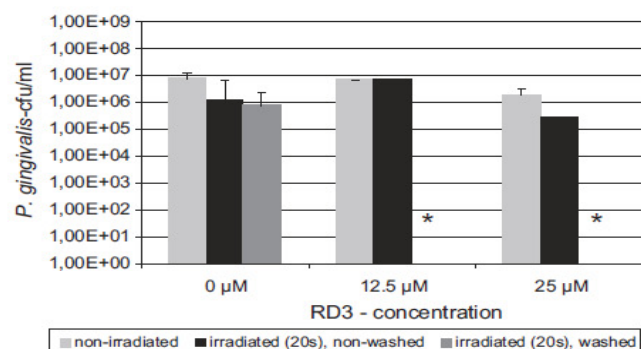


Fig. 5 – Comparative effects of PDT with different concentrations of RD3 photosensitizer (0, 12.5, 25 μ M/ml) on *P. gingivalis*. The samples were not washed or washed after incubation with RD3. Only in washed samples a significant bacterial growth inhibition was measured (* $p < 0.001$).

Susceptibility of periodontal pathogens to PDT has been reported by several authors.^{17,21,30–32} Photosensitizers like Toluidine Blue O (TBO) and chlorine-e₆-pentalysine conjugate (ce₆-5k) showed inhibitory effects on periodontopathogenic bacteria. For instance, the use of TBO irradiated with a He-Ne red laser for 30 s yielded an inactivation of 3.5 logarithmic steps for both *F. nucleatum* and *P. gingivalis* species.³¹ Although these experiments have shown to be efficient, the authors used lasers that are costly and involve the risk of eye damage.²⁶ The technique described in the present study uses a halogen light source that, in conjunction with the RD3 photosensitizer, brought about a more effective bacterial reduction by 4 logarithmic steps for *F. nucleatum* and a complete bacterial killing for *P. gingivalis*. Some other studies observed that light in the blue spectral range showed an effective photoinactivation of various Gram-negative bacteria in the presence of sensitizers such as porphyrins or ALA.³³

In order to achieve inactivation of *F. nucleatum* and *P. gingivalis*, previous investigations used higher fluence rates, which resulted either in higher exposure times or higher irradiance.^{31,34,35} The time of exposure to a light source depends on the light energy rate (W/cm²), but to avoid a heating effect and decrease exposure time, most authors use energy rates of 50–300 mW/cm². In the present study, the light doses were kept at much lower, clinically relevant levels (14 J/cm² for 20 s irradiation).

In the present study we tested two different procedures: in one of them, the bacterial solution was not washed before the illumination, whilst in the other, the samples were washed with PBS to remove unbound photosensitizer. Subsequently, the inhibitory effects of PDT showed different results, especially for *P. gingivalis*. Whereas in the un-washed sample no significant suppression of *P. gingivalis* was observed, the washing procedure increased the phototoxic effect of RD3 against *P. gingivalis* significantly. The reason could be the ability of an unbound photosensitizer to act like an optical filter in the unwashed solution, which reduces the phototoxic effect by absorbing the visible light.³⁶ In contrast to that, the washing process in the experiments with *F. nucleatum* showed no influence on the extent of the phototoxic effect. It can be assumed that the ability to bind to the cell structures varies between different bacterial species. With the excess photosensitizer removed, the dye molecules may bind to the cell membrane better. Matevski et al.³⁷ likewise observed higher killing rates of *P. gingivalis* in serum-free (washed) samples. The authors supposed that serum proteins might absorb or scatter light. An alternative explanation could be that serum components bind to *P. gingivalis* and protect it from activated photosensitizers. These observations justify the approach in clinical practice where washing with a physiological sodium chloride solution for 1 min is frequently employed after photosensitizer application.⁴

In conclusion, the results make the RD3 sensitizer, activated by a conventional hand-held photopolymerizer such as those used in daily dental practice for composite polymerization, a promising means for PDT against two important periodontopathogenic bacteria. Thus, PDT with RD3 could become an alternative adjunct to antimicrobial periodontal treatment procedure. Further research will be necessary to adapt RD3-PDT to a clinical approach.

Funding: No funding was employed.

Competing interest: It exist no conflict of interests.

Ethical approval: No ethical approval was necessary.

REFERENCES

- Philstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005;366:1809–20.
- Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer Jr RJ et al. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:2837–48.
- Duarte PM, Tezolin KR, Figueiredo LC, Feres M, Bastos MF. Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol* 2010;55:142–7.
- Sigus BW, Engelbrecht M, Voelpel A, Holletschke A, Pfister W, Schütze J. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy (PDT) in *F. nucleatum* infected periodontitis patients. *J Periodontol* 2010;81:975–81.
- Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000;27:648–57.
- Jewett A, Hume WR, Le H, Huynh TN, Han YW, Cheng G, et al. Induction of apoptotic cell death in peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells by an oral bacterium, *Fusobacterium nucleatum*. *Infect Immun* 2000;68:1893–8.
- Brozovic S, Sahoo R, Barve S, Shiba H, Uriarte S, Blumberg RS, et al. *Porphyromonas gingivalis* enhances FasL expression via up-regulation of NFkappaB-mediated gene transcription and induces apoptotic cell death in human gingival epithelial cells. *Microbiology* 2006;152:797–806.
- Hall ER, Martin SA, Suzuki JB, Falkler WA. The gingival immune response to periodontal pathogens in juvenile periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1994;9:327–34.
- Sigus BW, Güntsch A, Pfitzner A, Glockmann E. Enhanced root planning and systemic mitronidazol administration improve clinical and microbiological outcomes in a two-step treatment procedure. *J Periodontol* 2004;76:991–7.
- Saxén L, Asikainen S, Kanervo A, Kari K, Jousimies-Somer H. The long-term efficacy of systemic doxycycline medication in the treatment of localized juvenile periodontitis. *Arch Oral Biol* 1990;35:227–9.
- Sigus BW, Beier M, Klinger G, Pfister W, Glockmann E. A 2-step non-surgical procedure and systemic antibiotics in the treatment of rapidly progressive periodontitis. *J Periodontol* 2001;72:275–83.
- Xu Y, Wei W. A comparative study of systemic subantimicrobial and topical treatment of minocycline in experimental periodontitis of rats. *Arch Oral Biol* 2006;51:794–803.
- Page RC. The microbiological case for adjunctive therapy for periodontitis. *J Int Acad Periodontol* 2004;6:143–9.
- Staudte H, Güntsch A, Völpe A, Sigus BW. Vitamin C attenuates the cytotoxic effects of *Porphyromonas gingivalis* on human gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol* 2010;55:40–5.
- Bakri IM, Douglas CWI. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Arch Oral Biol* 2005;50:645–51.
- de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Tabo M. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol* 2007;78:965–73.
- Pfitzner A, Sigus BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol* 2004;75:1343–9.
- Sigus BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol* 2005;76:1100–5.
- Jori G, Brown SB. Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:403–5.
- Bhatti M, Nair SP, MacRobert AJ, Henderson B, Shepherd P, Cridland J, et al. Identification of photolabile outer membrane proteins of *Porphyromonas gingivalis*. *Curr Microb* 2001;43:96–9.
- Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. A study of the uptake of toluidine-blue-o by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. *Photochem Photobiol* 1998;68:370–6.
- Villén L, Manjón F, García-Fresnadillo D, Orellana G. Solar water disinfection by photocatalytic singlet oxygen production in heterogeneous medium. *Appl Catal B Environ* 2006;69:1–9.
- García-Fresnadillo D, Georgiadou Y, Orellana G, Braun AM, Oliveros E. Singlet-oxygen ($^1\Delta_g$) production by ruthenium(II) complexes containing polyazaheterocyclic ligands in methanol and in water. *Helv Chim Acta* 1996;79:1222–38.
- Hergueta-Bravo A, Jimenez-Hernandez ME, Montero F, Oliveros E, Orellana G. Singlet oxygen-mediated DNA photocleavage with Ru(II) polypyridyl complexes. *J Phys Chem B* 2002;106:4010–7.
- Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei G, Tedesco AC, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 2005;50:353–9.
- Satrom KD, Morris MA, Crigger LP. Potential retinal hazards of visible-light photopolymerization units. *J Dent Res* 1987;66:731–6.
- Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Anticancer Agents Chemother* 2005;49:2329–35.
- Dahl TA, Midden WR, Hartmann PE. Comparison of killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *J Bacteriol* 1989;171:2188–94.
- Killing F, Kunz L, Stark G. Photomodification of the electrical properties of photosensitizers. *J Membrane Biol* 2001;181:41–6.
- Henry CA, Dyer B, Wagner M, Judy M, Matthews JL. Phototoxicity of argon laser irradiation on biofilms of *Porphyromonas* and *Prevotella* species. *J Photochem Photobiol B* 1996;34:123–8.
- Feuerstein O, Persman N, Weiss E. Phototoxic effect of visible light on *P. gingivalis* and *F. nucleatum*: an in vitro study. *Photochem Photobiol* 2004;80:412–5.
- Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch Oral Biol* 1992;37:883–7.
- Fotinos N, Convert M, Piffaretti JC, Gurny R, Lange N. Effects on Gram-negative and Gram-positive bacteria mediated by 5-aminolevulinic acid and 5-aminolevulinic acid derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1366–73.
- Langmack KR, Mehta P, Twyman P, Norris P. Topical photodynamic therapy at low fluence rates—theory and practice. *J Photochem Photobiol B* 2001;60:37–43.
- Rovaldi CR, Pievski A, Sole NA, Friden PM, Rothstein DM, Spacciapoli P. Photoactive Porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:3364–7.
- Merchat M, Giacomoni P, Villanueva A, Bertoloni G, Jori G. Photosensitization of bacteria to visible light by meso-substituted porphyrins. *J Braz Chem Soc* 1995;6:123–5.
- Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, Wilson B, Ellen RP, Lepine G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. *J Periodont Res* 2003;38:428–35.

Diskussion

Die Wirksamkeit der photodynamischen Therapie ist bereits in einigen Studien untersucht worden, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Dobson 1992, Bhatti 1998, Feuerstein 2004, Pfitzner 2004, Sigusch 2005, de Oliveira 2007, Braun 2008). Dabei konnte die phototoxische Wirkung auf parodontopathogenen Bakterien von einigen Photosensitizern, wie z. B. Toluidinblau (TBO) und Chlor-Lysin-Derivaten nachgewiesen werden. Zum Beispiel wirkt TBO nach seiner Aktivierung mit einer He-Ne Laserquelle (30s) antibakteriell auf *F. nucleatum* und *P. gingivalis* (Feuerstein 2004).

Die Laseranwendung steht jedoch in Zusammenhang mit hohen Kosten und Gefahren für die menschliche Gesundheit, z. B. durch Schäden an der Retina bei fehlenden Schutzmaßnahmen (Satrom 1987). Unter diesem Gesichtspunkt ist die Aktivierung durch weniger gefährliche Lichtquellen, wie eine Halogenlampe, interessant.

In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Kombination eines Rutheniumderivats mit einer Halogenlampe im Rahmen der PDT erfolgreich *F. nucleatum* und *P. gingivalis in vitro* im Wachstum hemmt. Dieses Ergebnis stützt die Erkenntnisse anderer Forschungsgruppen, die ebenfalls mit Licht im blauen Spektralbereich experimentieren und für verschiedene photoaktive Substanzen, wie z. B. für Porphyrine oder Aminolävulinsäure (ALA) eine antibakterielle Wirkung auf Gram-negativen Bakterien nachweisen konnten (Fotinos 2008)

Licht im blauen Bereich des Spektrums wurde bereits in einigen Studien angewendet. Feuerstein et al (2004) hat die Wirkung des blaues Lichts von drei verschiedenen Lichtquellen auf Bakterien der Mundhöhle untersucht. Die Anwendung von Energiedichten von 16-62 J/cm² führte zur Eliminierung der Gram-negativen, parodontopathogenen Bakterien *F. nucleatum* und *P. gingivalis*. Soukos et al (2005) zeigte ebenfalls dass, die Anwendung des blaues Lichts (380-520 nm), das Wachstum von *P. ginigivalis* von 22.75-98.5 % hemmt, und gleichzeitig die Bakterien *Prevotella intermedia* und

Prevotella nigrescens komplett supprimiert. Fukui et al. (2008) wiesen eine Reduktion der Vitalität von *P. gingivalis* nach der Bestrahlung für 38-300 Sekunden mit blauem Licht im 400-410 nm Spektralbereich um 75% nach.

In den meisten Untersuchungen wurden jedoch höhere Energiedichten ($50\text{-}300\text{ J/cm}^2$) als in der vorliegenden Studie (14 J/cm^2) verwendet (Rovaldi 2000, Langmach 2001, Feuerstein 2004). Intention war die Vermeidung einer Überhitzung durch höhere Energieraten bei gleichzeitig geringeren Expositionszeiten. Die relativ geringe Energiedichte in der vorliegenden Studie war bei einer Belichtungszeit von 20 Sekunden ausreichend für den antibakteriellen Effekt ohne deutliche Erwärmung des verwendeten Mediums.

Mehrere Substanzen wurden im Rahmen der PDT untersucht: Hematoporphrin HCL, Phthalocyanine, Chlorine e6-pentalysin konjugierte und Aminolävulinsäure (5-ALA). Die vorliegende Studie wies nun erstmals den antibakteriellen Effekt von Ru-Derivaten auf parodontopathogenen Bakterienspezies nach.

Ruthenium, als chemisches Element, ist ein Metall und gehört zur Platin Gruppe. Es formt Polypyridine Komplexe, wie bipyridine und terpyridine. Ruthenium-Polypyridil Komplexe sind bekannt als phototoxische Substanzen für die Photodynamische Therapie im Rahmen der Anti-Krebs-Therapie (Smith 2011, Howerton 2012). Der bekannteste Komplex ist tris(bipyridine)ruthenium(II) chloride. Monro et al. (2011) zeigten außerdem, dass Ruthenium-Derivate mit 1,10 phenanthroline Liganden in einer Konzentration von 5-20 mM eine Toxizität auf Zellen ausüben, nach Aktivierung mit einer entsprechenden Lichtquelle. Derartige Ruthenium-Derivate wurden in ähnlichen Konzentrationen in der vorliegenden Studie angewendet. Ruthenderivate sind bisher auch für ihren Gebrauch bei der photodynamischen Desinfektion von Wasser bekannt (Villen 2006).

In der vorliegenden Studie wirkte jedoch nur eines der drei untersuchten Derivate signifikant phototoxisch und zwar das zweiwertige, hydrophobe Kation [tris-(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)-ruthenium(II)-dication], kurz

RD3 genannt. Dies ist vermutlich auf die Bindungsfähigkeit und die Bindungsstärke an die Bakterienzellwand zurückzuführen, welche für den Effekt der PDT von entscheidender Bedeutung ist (Demidova 2005). Möglicherweise bindet sich das positiv geladene, hydrophobe Molekül von RD3 besser an die negativ geladene Bakterienzellwand als die beiden anderen Substanzen.

Ebenso spielt die Menge der gebildeten freien Sauerstoffradikale für den phototoxischen Effekt eine wichtige Rolle, da diese die Stabilität der Zellwand beeinflussen. Für RD3 konnte nachgewiesen werden, dass es nach Aktivierung höhere Mengen an Sauerstoffradikalen produziert als das Rutheniumderivat RBY (Quantenausbeute von $^1\text{O}_2$ Produktion: RBY:0.73 in CH_3OH Lösung und 0.22 in H_2O , RD3 und RSD3: 1.0 in CH_3OH Lösung und 0.43 in H_2O) (Garcia-Fresnadillo 1996). Obwohl RD3 und RSD3 ähnliche Sauerstoffradikalmengen produzieren, ist deren phototoxischer Effekt unterschiedlich. Es könnte die Penetration durch die Bakterienzellwand eine wichtige Rolle spielen, die möglicherweise für RD3 günstiger ausfällt (Dahl 1989, Killing 2001).

Außerdem wurden in der vorliegenden Studie zwei verschiedene Behandlungsverfahren untersucht, (1) mit Entfernung ungebundener PS-Moleküle durch einen Waschschrift mit PBS und (2) ohne Waschschrift. Besonders für *P. gingivalis* beeinflusste diese Vorgehensweise die Wirkung der PDT. In dem Untersuchungsansatz mit dem Waschschrift konnte eine deutliche phototoxische Wirkung nachgewiesen werden, während der Ansatz ohne PBS-Spülung nahezu ohne antibakteriellen Effekt der PDT blieb.

Möglicherweise wirken freie PS-Moleküle wie ein Filter, der die Menge des auftreffenden Lichtes auf die Bakterienzellwand vermindert (Merchat 1995). Erstaunlicherweise war der Waschprozess aber für den Effekt auf *F. nucleatum* ohne Bedeutung. Es wäre daher denkbar, dass das Bindungsvermögen der Photosensitizer auch von der jeweiligen Bakterienspezies abhängig ist und spezifische Unterschiede aufweist. Dennoch konnten Matevski et al. (2003) ebenfalls nachweisen, dass ein

Waschschritt und die damit verbundene Entfernung freier Proteine aus dem Medium einen stärkeren antibakteriellen Effekt der anschließenden PDT auf *P. gingivalis* bewirkte. Das Kulturmedium für *P. gingivalis* enthält normalerweise Plasmaproteine, die Licht absorbieren oder reflektieren könnten. Denkbar wäre auch ein Anheften dieser Proteine an die Bakterienoberfläche und ein damit verbundener Schutz vor dem Lichteinfluss. Vor diesem Hintergrund erscheint ein Spülschritt vor der eigentlichen PDT-Behandlung auch in der klinischen Anwendung als sinnvoll, da in der Sulkusflüssigkeit ebenfalls Proteinbestandteile vorkommen. Derartige Spüllungsprozesse des Sulkus für 1 Minute mit Sodiun-Chloride Lösung sind bereits in der Literatur erwähnt worden (Bhatti 1998)

Die vorliegende Studie zeigte die Phototoxische Wirkung des Ruthenium Photosensitizers RD3 auf die zwei parodontopathogenen Bakterien *F. nucleatum* und *P. gingivalis*, nach der Aktivierung mit einer Halogen Lampe *in vitro*. Es sollte zukünftig untersucht werden, ob auch für die Kombination des Ruthenium-Photosensitizers und des blauen Lichts eine Wirkung auf parodontalpathogene Spezies *in vivo* und ähnliche Ergebnisse in der klinischen Anwendung zu erzielen sind.

Schlussfolgerungen

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie, dass der Photosensitizer RD3 nach Aktivierung mit einer Halogenlampe phototoxische Effekte auf *F. nucleatum* und *P. gingivalis* aufweist. Damit scheint dieser Photosensitizer ein möglicher Kandidat für die klinische Anwendung im Rahmen der antimikrobielle PDT zur Behandlung der Parodontitis zu sein.

Von den drei untersuchten Sensitizern, zeigte das hydrophobe Molekül RD3 die beste Wirkung. Möglicherweise bindet sich das positiv geladene RD3, besser an die negativ geladene Bakterienzellwand als die beiden anderen Substanzen.

Außerdem zeigte sich, dass die Bakterien, die nur mit dem Photosensitizer behandelt, jedoch nicht mit Licht aktiviert wurden und Bakterien, die nur mit Licht bestrahlt wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe (ohne Photosensitizer, ohne Lichtaktivierung), keine statistisch signifikante Verminderung der Vitalität aufwiesen.

Die verwendete, relativ geringe, Energiedichte in der vorliegenden Studie war bei einer Belichtungszeit von 20 s ausreichend für den antibakteriellen Effekt ohne deutliche Erwärmung der Umgebung.

In dem Untersuchungsansatz mit dem Waschschrift konnte eine deutlich bessere phototoxische Wirkung nachgewiesen werden. Vor diesem Hintergrund erscheint ein Spülschritt vor der eigentlichen PDT-Behandlung auch in der klinischen Praxis als sinnvoll.

Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Al-Zahrani MS, Bamshmous SO, Alhassani AA, Al-Sherbini MM. Short-term effects of photodynamic therapy in periodontal status and glycemic control of patients with diabetes. *J Periodontol* 2009;80:1568–1573.
2. Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *J Clin Dent* 2007;18:34–38.
3. Bakril M, Douglas CWI. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Arch Oral Biol* 2005;50:645–51.
4. Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. A study of the uptake of toluidine-blue-o by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. *Photochem Photobiol* 1998; 68:370–6.
5. Bhatti M, Nair SP, MacRobert AJ, Henderson B, Shepherd P, Cridland J, et al. Identification of photolabile outer membrane proteins of *Porphyromonas gingivalis*. *Curr Microb* 2001; 43:96–9.
6. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2008; 35:877–884.
7. Brozovic S, Sahoo R, Barve S, Shiba H, Uriarte S, Blumberg RS, et al. *Porphyromonas gingivalis* enhances FasL expression via up-regulation of NF kappa B-mediated gene transcription and induces apoptotic cell death in human gingival epithelial cells. *Microbiology* 2006; 152:797–806.
8. Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rossler R, Gutknecht N, Sculean A. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* 2009; 24:681–688.

9. Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rossler R, Sculean A. Photodynamic therapy as an adjunct to non surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol* 2008;79: 1638–1644.
10. de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Tabo M. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol* 2007;78:965–73.
11. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Anticancer Agents Chemother* 2005;49:2329–35.
12. Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer Jr RJ et al. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:2837–48.
13. Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch Oral Biol* 1992;37:883–7.
14. Duarte PM, Tezolin KR, Figueiredo LC, Feres M, Bastos MF. Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol* 2010; 55:142–7.
15. Feuerstein O, Persman N, Weiss E. Phototoxic effect of visible light on *P. gingivalis* and *F. nucleatum*: an in vitro study. *Photochem Photobiol* 2004;80:412–5.
16. Flemmig TF. Periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):32-8.
17. Fotinos N, Convert M, Piffaretti JC, Gurny R, Lange N. Effects on Gram-negative and Gram-positive bacteria mediated by 5-aminolevulinic acid and 5-aminolevulinic acid derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1366–73.

18. Fukui M, Yoshioka M, Satomura K, Nakanishi H, Nagayama M.
Specific-wavelength visible light irradiation inhibits bacterial growth of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 2008; 43: 174–178.
19. Garcia-Fresnadillo D, Georgiadou Y, Orellana G, Braun AM, Oliveros E. Singlet-oxygen(¹Dg) production by ruthenium(II) complexes containing polyazaheterocyclic ligands in methanol and in water. *Helv Chim Acta* 1996;79:1222–38.
20. Haffajee, A. D., Dibart, S., Kent, R. L. & Socransky, S. S. Clinical and microbiological changes associated with the use of 4 adjunctive systemically administered agents in the treatment of periodontal infections. *Journal of Clinical Periodontology* 1995;22: 618–627.
21. Haffajee, A. D., Dzink, J. L. & Socransky, S. S. Effect of modified widman flap surgery and systemic tetracycline on the subgingival microbiota of periodontal lesions. *Journal of Clinical Periodontology* 1988;15:255–262.
22. Haffajee, A. D., Socransky, S. S. & Gunsolley, J. C. Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Annals of Periodontology* 2003;8:115–181
23. Hall ER, Martin SA, Suzuki JB, Falkler WA. The gingival immune response to periodontal pathogens in juvenile periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 9:327–34.
24. Henry CA, Dyer B, Wagner M, Judy M, Matthews JL. Phototoxicity of argon laser irradiation on biofilms of *Porphyromonas* and *Prevotella* species. *J Photochem Photobiol B* 1996;34:123–8.
25. Hergueta-Bravo A, Jimenez-Hernandez ME, Montero F, Oliveros E, Orellana G. Singlet oxygen-mediated DNA photocleavage with Ru(II)polypyridyl complexes. *J Phys Chem B* 2002;106:4010–7.
26. Herrera, D., Sanz, M., Jepsen, S., Needleman, I. & Roldan, S. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct

- to scaling and root planing in periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* 29 (Suppl. 3) 2002, 136–159
27. Howerton BS, Heidary DK, Glazer EC Strained ruthenium complexes are potent light-activated anticancer agents. *J Am Chem Soc.* 2012;134(20):8324-7.
 28. Jewett A, Hume WR, Le H, Huynh TN, Han YW, Cheng G, et al. Induction of apoptotic cell death in peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells by an oral bacterium, *Fusobacterium nucleatum*. *Infect Immun* 2000; 68:1893–8.
 29. Jori G, Brown SB. Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:403–5.
 30. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. *J Periodontol* 1993; 64(4):243-53.
 31. Kornman, K. S. & Robertson, P. B. Clinical and microbiological evaluation of therapy for juvenile periodontitis. *Journal of Periodontology* 1985; 56, 443–446.
 32. Langmack KR, Mehta P, Twyman P, Norris P. Topical photodynamic therapy at low fluence rates—theory and practice. *J Photochem Photobiol B* 2001;60:37–43.
 33. Lindhe, J. & Liljenberg, B. Treatment of localized juvenile periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 1984;11:399–410.
 34. Lulic M, Leigegener GI, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, Lang NP. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2009;36: 661–666.
 35. Mandell, R. L., Tripodi, L. S., Savitt, E., Goodson, J. M. & Socransky, S. S. The effect of treatment on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. *Journal of Periodontology* 1984;57:94–99

36. Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, Wilson B, Ellen RP, Lepine G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. *J Periodont Res* 2003;38:428–35.
37. Merchat M, Giacomoni P, Villanueva A, Bertoloni G, Jori G. Photosensitization of bacteria to visible light by meso-substituted porphyrins. *J Braz Chem Soc* 1995;6:123–5.
38. Monro S, Scott J, Chouai A, Lincoln R, Zong R, Thummel RP, McFarland SA. Photobiological activity of Ru(II) dyads based on (pyren-1-yl)ethynyl derivatives of 1,10-phenanthroline. *Inorg Chem*. 2010;49(6):2889-900.
39. Page RC. The microbiological case for adjunctive therapy for periodontitis. *J Int Acad Periodontol* 2004;6:143–9.
40. Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei G, Tedesco AC, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 2005;50:353–9.
41. Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol* 2004;75:1343–9.
42. Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 575–580.
43. Rovaldi CR, Pievski A, Sole NA, Friden PM, Rothstein DM, Spacciapoli P. Photoactive Porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:3364–7.
44. Ruhling A, Fanghänel J, Houshmand M, Kuhr A, Meisel P, Schwahn C, Kocher T. Photodynamic therapy of persistent pockets in maintenance patients – a clinical study. *Clin Oral Invest* Published electronically: DOI: 10.1007/s00784- 009-0347-4.

45. Satrom KD, Morris MA, Crigger LP. Potential retinal hazards of visible-light photopolymerization units. *J Dent Res* 1987;66:731–6.
46. Sigusch BW, Engelbrecht M, Voelpel A, Holletschke A, Pfister W, Schütze J. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy (PDT) in F. nucleatum infected periodontitis patients. *J Periodontol* 2010; 81:975–81.
47. Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol* 2005;76:1100–5.
48. Smith GS, Therrien B. Targeted and multifunctional arene ruthenium chemotherapeutics. *Dalton Trans.* 2011;40(41):10793-800.
49. Soukos NS, Som S, Abernethy AD, Ruggiero K, Dunham J, Lee C, Doukas AG, Goodson JM. Phototargeting oral blackpigmented bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49: 1391–1396.
50. Staudte H, Güntsch A, Völpe A, Sigusch BW. Vitamin C attenuates the cytotoxic effects of *Porphyromonas gingivalis* on human gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol* 2010;55:40–5.
51. van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. (1996). Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol* 2000;10:45-78.
52. Villen L, Manjon F, Garcia-Fresnadillo D, Orellana G. Solar water disinfection by photocatalytic singlet oxygen production in heterogeneous medium. *Appl Catal B Environ* 2006;69:1–9.
53. Walker, C. B., Gordon, J. M., Magnusson, I. & Clark, W. B. A role for antibiotics in the treatment of refractory periodontitis. *Journal of Periodontology* 1993;64, 772–781.
54. Ximenez-Fyvie L A, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27:648–57.

55. Xu Y, Wei W. A comparative study of systemic subantimicrobial and topical treatment of minocycline in experimental periodontitis of rats. *Arch Oral Biol* 2006;51:794–803.
56. Yilmaz S, Kuru B, Kuru L, Noyan U, Argun D, Kadir T. Effect of gallium arsenide diode laser on human periodontal disease: a microbiological and clinical study. *Lasers Surg Med* 2002;30: 60–66.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vorname: Vasiliki
Name: Papastamou
Geburtsdatum: 14.03.1982
Geburtsort: Lamia, Griechenland
Familienstand: ledig
Anschrift: Aristeidou 20 Str., 15562,
Athen, Griechenland

Werdegang:

09/2007-07/2010:

Spezialisierung (3-jähriges Weiterbildungsprogramm),
Abteilung für Parodontologie, Universität Athen, Griechenland

Seit 01/2006: Doktorandin an der Friedrich-Schiller-Universität, Jena,
Deutschland

1999-2005:

Studium der Zahnmedizin, National Universität Athen, Griechenland

1987-1999:

Grundschule und Gymnasium, Lamia, Griechenland

Wissenschaftliche Vorleistungen:

06/2012:

Postervorstellung auf der 7. Europerio Kongress, Wien, Österreich

(„Association of periodontal disease with rheumatoid arthritis: a case-control study“)

07/2011:

Verteidigung der Masterarbeit mit Thema: „Klinische Evaluierung des Parodontalstatus von Patienten mit Rheumatoid Arthritis“, Athen, Griechenland

2007-2010:

Masterarbeit mit dem Thema „Klinische Evaluierung des Parodontalstatus von Patienten mit Rheumatoid Arthritis“, Athen, Griechenland

09/2007:

Postervorstellung auf der 42. IADR Jahreskongress, Thessaloniki, Griechenland („Photoinactivating periodontopathogens by a halogen lamp and novel Ruthenium-complexes“)

07/2007:

Postervorstellung auf der Jahrestagung 2007 der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie, Bonn, Deutschland („Suppression parodontalpathogener Bakterien durch PDT mit Photosensibilisatoren und Halogenlampe“)

06/2006:

Postervorstellung auf der 5. Europäer Kongress, Madrid, Spanien
(„Completely unerupted wisdom teeth increase the risk of periodontitis“)

Seit 01/2006:

Doktorandin der Friedrich-Schiller-Universität Jena

06/2004:

Vorstellung der wissenschaftlichen Arbeit mit dem Thema: „Endodontologische-parodontologische Therapiekonzepte“ auf der 10. Studentenkongress, Athen, Griechenland

2002-2013:

Teilnahme an zahnmedizinische Fachkongressen

Assistenzzeit:

09/2007-07/2010:

Spezialisierung (3-jähriges Weiterbildungsprogramm)

Abteilung für Parodontologie, Universität Athen, Griechenland

11/2006-02/2007:

Gastzahnärztin an der Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie,
Friedrich-Schiller-Universität Jena

11/2005-11/2006:

Gastzahnärztin an der Abteilung für Parodontologie der

Poliklinik für Konservierende Zahnheilkunde, Friedrich-Schiller-Universität
Jena

2003-2005:

Assistentin in der Praxis von Hr. Prof. Dr. G. Siskos, Athen, Griechenland

Fremdsprachkenntnisse:

- Englisch
- Deutsch
- Französisch

Veröffentlichungen

1. Photoinactivation of *F. nucleatum* and *P. gingivalis* using the ruthenium-based RD3 sensitizer and a conventional halogen lamp.

Papastamou V, Nietzsche T, Staudte H, Orellana G, Sigusch BW.

Arch Oral Biol. 2011;56(3):264-8.

2. Periodontitis and autoimmune diseases: is there a link between the two conditions? Review

Madianos PN, Papastamou V

Odontostomatologiki Proodos Mai-August, Athen, Griechenland 2009

3. Combination of 10% EDTA, Photosan, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry in vitro.

Maisch T, Wagner J, Papastamou V, Nerl HJ, Hiller KA, Szeimies RM, Schmalz G.

J Appl Microbiol. 2009;107(5):1569-78.

Jena, den 03.02.2015

ZÄ Vasiliki Papastamou

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich alle denen danken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Univ.-Professor Dr. Dr. B. W. Sigusch danke ich herzlich für die Überlassung und Betreuung des Themas und seine fortwährende ideelle Unterstützung der Arbeit. Er hatte nicht nur immer ein offenes Ohr und Zeit für fachliche Diskussionen, sondern auch die allgemeinen Probleme des Laboralltags und darüber hinaus. Mit seiner Erfahrung war er mir ein Mentor in allen Bereichen des wissenschaftlichen Arbeitens.

Univ.- Prof. Dr. G. Orellana möchte ich an dieser Stelle besonders danken, der die Arbeit von Anfang an unterstützte und eine große Hilfe bei der Anfertigung der Photosensitizern war. Er hatte immer ein offenes Ohr bei Fragen und Problemen.

Für die unkomplizierte anhaltende Unterstützung der Laborarbeit durch Dipl. Ing. A. Völpel, Fr. Tonndorf- Martini und Fr. B. Hoffmeister bin ich sehr dankbar. Probleme gab es für Sie keine – nur Lösungen.

Dr. Thomas Nietzsche war mir eine große Hilfe bei der Planung der Experimenten. Geduldig beantwortete er alle meine Nachfragen und half mir Lösungen für die immer wieder auftretenden Probleme zu finden.

Für ihre Unterstützung sowie ihre Diskussionsbereitschaft bin ich Dr. H. Staudte sehr dankbar.

Meine Eltern und meine Familie trugen durch ihre finanzielle und ideelle Unterstützung über die vielen Jahre dazu bei, dass ich den von mir gewählten Weg gehen konnte. Mit Sicherheit war es nicht immer leicht zu verstehen, wenn ich sie wieder einmal verträsten musste und statt bei ihnen zu sein, einige Jahren im Ausland verbringen sollte.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Univ.-Prof. Dr. Dr. B. W. Sigusch, Dipl. Ing. A. Völpel, Fr. Tonndorf-Martini, Fr. B. Hoffmeister, Dr. med. dent. T. Nietzsche und Dr. H. Staudte.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 03.02.2015

ZÄ Vasiliki Papastamou